

鼻咽癌候选侵袭和转移相关基因的筛选

刘真¹, 方唯意²

(1. 广州医学院 病理教研室, 广东 广州 510182; 2. 南方医科大学 肿瘤研究所, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 筛选影响鼻咽癌侵袭和转移能力的相关基因。方法 利用 cDNA 基因芯片, 比较高转移鼻咽癌细胞株 5-8F 和非转移鼻咽癌细胞株 6-10B 之间的差异表达基因, 并利用在线 Milano 程序筛选鼻咽癌侵袭和转移相关基因, GOstat 分析这些基因功能, 最后荧光定量 PCR 鉴定差异表达基因。结果 芯片分析结果显示, 鼻咽癌细胞株 5-8F 与 6-10B 之间共有 200 多个差异表达基因。基于 Milano 程序分析后, 发现与侵袭和转移能力相关的基因有 33 个, 其中 27 个上调, 6 个下调。GOstat 分析显示, 这些基因参与了细胞移动、调节凋亡、细胞黏附等。结论 经在线 Milano 程序分析鉴定的鼻咽癌 5-8F 和 6-10B 细胞株之间的这 33 个差异表达基因可能参与了鼻咽癌的侵袭和转移。

关键词: 鼻咽癌; 基因芯片; 侵袭和转移能力

中图分类号: R 739.63 **文献标识码:** A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.021

文章编号: 1006-8783(2011)01-0081-05

Screening of potentially invasive and metastatic genes in nasopharyngeal carcinoma (NPC)

LIU Zhen¹, FANG Wei-yi²

(1. Department of Pathology, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510182, China;

2. Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To screen potential genes associated with invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma. **Methods** cDNA microarray was used to detect the differential expression in 5-8F cells with the ability of high metastasis and 6-10B cells lacking the metastatic ability. Subsequently, genes of invasive and metastasis were screened by Milano software tool. The function of these genes was analyzed by GOstat program. And real-time PCR was utilized to confirm the reliability of differentially expressed genes. **Results** More than 200 genes were identified to have the differential expression. After the analysis with Milano software tool, 33 genes were found to be likely associated with cell invasion and metastasis. Among these genes, 27 genes were showed to be upregulated, and 6 genes were indicated to be downregulated. Finally, the reliability of differentially expressed genes was confirmed by real-time PCR. **Conclusion** Differentially expressed genes shown in NPC 5-8F cells compared to 6-10B cells with the identification of online Milano program analysis were likely associated with the invasion and metastasis of NPC cells.

Key words: NPC; microarray; invasive and metastatic ability

收稿日期: 2010-09-26

基金项目: 国家自然科学基金委与广东省联合基金(u0732006); 广州市科技局科技攻关项目(2004z2-E0111)

作者简介: 刘真(1980-), 女, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤分子机制研究; 通讯作者: 方唯意, 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事鼻咽癌病因发病学研究。

网络出版时间: 2011-01-21 17:20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1720.022.html>

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC) 具有独特的流行病学特征,高发于我国南方、东南亚等地区。其发病过程与环境致癌因素、遗传易感性和 EB 病毒相关^[1]。临床上患者就诊时往往已经出现了鼻咽癌侵袭和转移的症状,如头痛、耳鸣、骨痛、颈部淋巴结肿大等,此时患者的病情已经到了中晚期,错过了最佳治疗时机。因此,找到影响鼻咽癌侵袭和转移的重要相关基因成为鼻咽癌治疗的关键因素。

本研究利用 cDNA 基因芯片技术比较了具有高转移能力的鼻咽癌细胞株 5-8F 与非转移细胞株 6-10B 之间的差异表达基因,结合在线 Milano^[2] 程序筛选这些差异表达基因。最后,利用 GOstat 程序分析这些基因的主要功能,以期找到关键的鼻咽癌转移相关基因,从而为鼻咽癌的治疗提供关键靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞株的培养

鼻咽癌细胞株 5-8F 和 6-10B^[3]: 低分化鼻咽癌细胞株。鼻咽癌 5-8F 细胞株具有高转移能力,而 6-10B 细胞株缺乏转移能力。这两株细胞生长培养基为 1640 + 10% NBCS(新生牛血清),在 37 ℃、5% (φ) CO₂ 的环境下培养。

1.2 RNA 提取

鼻咽癌细胞 RNA 常规提取后经德国 Qiagen 公司 RNeasy Mini Kit 纯化(方法见试剂盒说明),最后加入适量焦碳酸二乙酯(DEPC) 水溶解沉淀,测定 RNA 样品浓度和总量。琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量,合格样品保存于 -80 ℃ 超低温冰箱。

1.3 芯片杂交

利用深圳微芯公司的 cDNA 芯片进行研究。5-8F 和 6-10B 细胞株在反转录过程中分别用 Cy3 标记和 Cy5 标记。将标记好的探针(Cy3/Cy5) 等量混匀(各 40 pmol/L),抽干后,按顺序加入下列试剂: 4 × 杂交缓冲液 7.5 μL,甲酰胺 15 μL,加灭菌水至总体积 30 μL。充分溶解并混匀后短暂离心,95 ℃ 水浴 5 min,立刻置于冰上 1 min,振荡混匀后短暂离心,将混好的探针铺在基因芯片有样品的一侧,然后加盖盖玻片,并放置于 42 ℃ 孵箱中 16 h。杂交结束后,取出玻片放于片夹上,将片夹放入预先放满去离子水的染色缸中,让盖玻片垂直并自然滑落;取出片夹,迅速放入另一个预先盛有 200 ~ 250 mL 预热至 55 ℃ 的洗脱液 I (0.1% SSC) 的染色缸中,将染色缸置于摇床上于室温缓慢摇晃 20 min;取出片夹,重

复洗涤 1 次后,取出玻片电干,待玻片完全干燥后,利用 Generation III Array Scanner 扫描仪进行扫描,随后进行数据分析和处理。差异表达基因筛选标准: (1) 荧光信号强度密度值大于 5×10^8 ; (2) 差异表达值大于 2 或小于 0.5 作为有意义表达基因。

1.4 在线 Milano 程序分析

面对如此众多的基因,如何快速找到目标基因具体功能就变得非常重要。Milano 分析(<http://milano.md.huji.ac.il>) 是 2005 年开放的在线分析网站。其能在 PubMed 中自动搜索文章里包含所输入搜索内容的共出现事件。通过这种方式可快速找到所需文献,了解基因的功能。

1.5 GOstat 分析

GO 是 Gene OntologyTM (GO) Consortium 制定的动态受控性词汇表,它提供了 3 种详细说明术语的结构网络来描述基因产物的特性,包括分子功能、生物学过程和细胞成分。GO 数据库是提供注释和分析大量基因功能的一个有用的工具。现代实验技术,例如 DNA microarrays,经常产生高通量的数据。为了找到这类数据的生物学功能,值得期待的是找到在这些数据中的功能注解或者基因分类簇。GOstat(<http://gostat.wehi.edu.au/>) 将帮助分析这类基因,并提供关于包含这类数据 GO 术语的统计表,分类 GO 注解,首先给出最有代表性的 GO 术语。将 Milano 筛选的基因利用 GO 分析,能够帮助我们找到这些基因的功能分类。

1.6 荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 在鼻咽癌细胞中检测这些差异表达基因,反应体系为 SYBR Premix Ex (2 ×) 10 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL、ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL、cDNA 模板 1 μL 和灭菌去离子水 7.8 μL,共 20 μL。反应条件如下: 94 ℃ 变性 2 min; 94 ℃ 变性 10 s; 55 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 15 s, 45 个循环; 最后,产物在 72 ℃ 延伸 5 min, 溶解曲线分析。实验重复 3 次。扩增的基因包括 MAPK1 (Sense: 5'-CTGTTCCCAAATGCTGACTCCA-3'; Antisense: 5'-CTCCCTTGCTAGAGCTCACTGTAT-3')、HSPB1 (Sense: 5'-GCTGACGGTCAAGACCAAGG-3'; Antisense: 5'-GCGTGTATTTCCGCGTGAAG-3')、CAV1 (Sense: 5'-TGCACTTTCCAAAGTTCTTGAACC-3'; Antisense: 5'-CCCGGATGGAACGGTGTAG-3')、CTSD (Sense: 5'-TCCAGCACCTACGTGAAGAATGG-3'; Antisense: 5'-GATGCCATCGAACTTGGCTGC-3')、

APOE(Sense: 5'-GAAGATGAAGGTTCTGTGGGCTGC-3'; Antisense: 5'-TAGGCCTTCAACTCCTTCATGGT-3')。

1.7 实验数据处理及分析

目的基因和看家基因实时荧光定量扩增曲线得到 *Ct*(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数, *C* 为 Cycle, *t* 为 threshold) 值,通过 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 公式,计算出目的基因相对于看家基因的表达强度。 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{肿瘤样品}} - \Delta Ct_{\text{正常样品}}$ 。目的基因相对肿瘤为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,当 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ 时,目的基因表达上调,反则下调。

2 结果

2.1 RNA 提取

提取鼻咽癌细胞总 RNA,图 1 中清晰可见 28 S 和 18 S 两条条带, A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 之间,可用于下一步芯片实验。

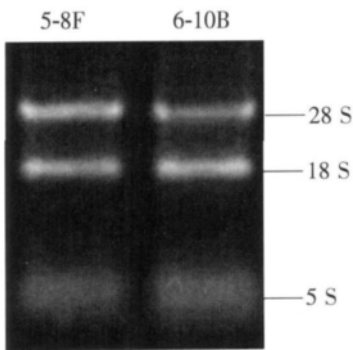


图 1 5-8F、6-10B 细胞株总 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 1% agarose gel electrophoretogram of total RNA of 5-8F and 6-10B cells

2.2 差异表达基因 Milano 程序筛选

高低转移能力鼻咽癌细胞株 5-8F 和 6-10B 之间共有 276 个差异表达基因。利用 Milano 程序,输入关键词 invasion 和 metastasis,在 Pubmed 数据库中搜索这些基因中与 invasion 和 metastasis 有关的基因。在排除假阴性基因后,一共找到 33 个与侵袭和转移相关的基因,其中 27 个基因上调,6 个基因下调。见表 1。

2.3 GOstat 程序分析

利用 GOstat 程序分析这 33 个基因功能聚类,结果发现这些基因主要与细胞运动、凋亡调节、蛋白激酶级联、细胞黏附以及细胞内过程调节等相关。见表 2。

2.4 荧光定量 PCR

利用实时荧光定量 PCR 技术验证 *MAPK1*、

HSPB1、*CAV1*、*APOE* 和 *CTSD* 这 5 个基因,报告显示,这 5 个基因在 5-8F 和 6-10B 细胞中都显示了差异表达,其结果与基因芯片的结果一致,提示基因芯片结果的相对可靠性。见图 2。

表 1 利用 Milano 筛选差异表达基因中与限定词 “invasion and metastasis” 有关的基因

Table 1 Milano analysis for differentially expressed genes with limited terms “invasion and metastasis”

基因	比值	染色体定位	在 Pubmed 点击论文篇数	
			侵袭	转移
<i>CTSD</i>	12.441	11p15.5	134	250
<i>HIF1A</i>	2.671	14q21-q24	63	96
<i>CAV1</i>	2.489	7q31.1	24	41
<i>CLDN7</i>	2.179	17p13	2	4
<i>ALCAM</i>	2.251	3q13.1	8	11
<i>MAPK1</i>	2.338	22q11.21	102	87
<i>A3AR</i>	13.277	1p13.2	0	3
<i>APOE</i>	11.568	19q13.2	13	4
<i>ELF3</i>	4.692	1q32.2	1	0
<i>F2R</i>	5.119	5q13	0	2
<i>HMOX1</i>	5.780	22q13.1	4	4
<i>ITGA5</i>	2.839	12q11-q13	0	1
<i>ST14</i>	2.851	11q24-q25	13	15
<i>CAV2</i>	2.478	7q31.1	4	1
<i>EPHB4</i>	2.629	7q22	10	5
<i>PRKCSH</i>	2.42	19p13.2	1	0
<i>MCM7</i>	2.199	7q21.3-q22.1	1	1
<i>TPM2</i>	2.289	9p13.2-p13.1	0	2
<i>MAP4K4</i>	2.192	2q11.2-q12	3	0
<i>ACTR2</i>	2.012	2p14	5	0
<i>CAPG</i>	2.194	2p11.2	3	1
<i>P63</i>	6.792	12q23.3	23	43
<i>BPAG1</i>	5.629	6p12-p11	7	4
<i>HSPB1</i>	2.393	7q11.23	8	16
<i>S100A2</i>	2.786	1q21	1	7
<i>LIMK1</i>	2.416	7q11.23	5	6
<i>RALB</i>	2.303	2cen-q13	2	2
<i>CDKN2C</i>	0.496	1p32	1	2
<i>CD63</i>	0.491	12q12-q13	7	25
<i>PSCA</i>	0.482	8q24.2	2	7
<i>NME1</i>	0.426	17q21.3	0	17
<i>ADM</i>	0.432	11p15.4	25	161
<i>EGR1</i>	0.179	5q31.1	7	15

表 2 GOstat 分析 33 个差异表达基因的功能
Table 2 Results of GOstat analysis for 33 differentially expressed genes

生物学过程	基因
Cell motility and locomotion	<i>APOE</i> 、 <i>HSPB1</i> 、 <i>S100A2</i> 、 <i>F2R</i> 、 <i>LIMK1</i>
Regulation of apoptosis	<i>APOE</i> 、 <i>HSPB1</i> 、 <i>NME1</i> 、 <i>F2R</i> 、 <i>MAPK1</i>
Protein kinase cascade	<i>PRKCSH</i> 、 <i>HMOX1</i> 、 <i>MAP4K4</i> 、 <i>F2R</i>
Cell adhesion	<i>ALCAM</i> 、 <i>ITGA5</i> 、 <i>LAMB1</i> 、 <i>CLDN7</i> 、 <i>BYSL</i>
Regulation of cellular process	<i>APOE</i> 、 <i>ELF3</i> 、 <i>NME1</i> 、 <i>HMOX1</i> 、 <i>CDKN2C</i> 、 <i>HIF1A</i> 、 <i>MCM7</i> 、 <i>HSPB1</i> 、 <i>EGR1</i> 、 <i>F2R</i> 、 <i>MAPK1</i> 、 <i>LAMB1</i> 、 <i>CAPG</i>

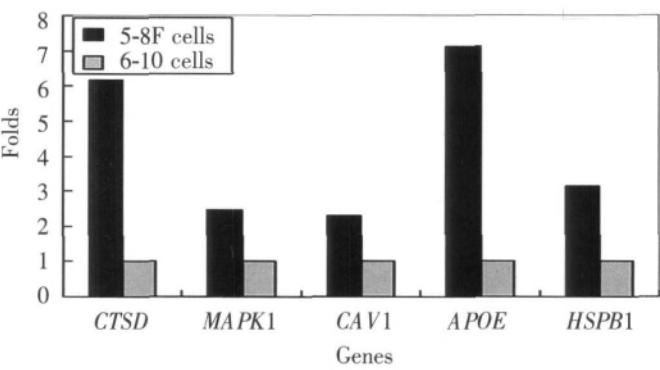


图 2 荧光定量 PCR 验证基因在 5-8F 和 6-10 细胞中表达差异
Figure 2 Real time PCR was used to confirm the differential expression of genes in 5-8F and 6-10B

3 讨论

鼻咽癌好发于我国广东省,俗有“广东瘤”之称。目前,对于鼻咽癌侵袭与转移的分子机制研究比较少,这主要因为鼻咽癌转移的临床标本很难获得。因此,本研究改变了策略,通过具有转移能力的鼻咽癌细胞探讨鼻咽癌转移的机理。鼻咽癌细胞株 5-8F 和 6-10B 来自于母细胞系 SUNE1,其遗传背景相对一致。这 2 株细胞最大不同在于 5-8F 细胞具有高转移能力,而 6-10B 细胞则缺乏转移能力。由于 2 个细胞株之间存在着如此大的差异,这就为研究鼻咽癌转移机制提供了很好的模板。

通过分析这两株细胞基因差异表达谱,共找到了 276 个差异表达基因。利用 Milano 在线程序分析这些基因,通过 invasion 和 metastasis 2 个限定词,一共找到了 33 个与侵袭和转移相关的基因,其中 27 个基因表达上调,6 个基因表达下调。此外,这些基因都有相应的文献支持其参与了肿瘤的侵袭和转移过程。进一步 GOstat 分析显示这些基因参与了细胞运动、凋亡调节和细胞黏附等过程。而这些功能与肿瘤细胞的侵袭和转移等相关。

原活化蛋白激酶 1(MAPK1) 在许多人类肿瘤中

呈普遍持续激活表达。血管内皮细胞生长因子(VEGF) 可通过 p38 MAPK 信号传导通路诱导的肝癌细胞转移,VEGF 可使肝癌细胞穿过基底膜胶原纤维向下室浸润能力增加 10 倍以上。预先使用 p38 MAPK 信号通路特异性阻断剂 SB203580,可抑制 95% 向下室浸润能力,也可减少 87% VEGF 诱导肝癌细胞浸润膜能力^[4]。MAPK1 在鼻咽癌中表达上调,提示该基因可能与其在其他肿瘤一样,促进了鼻咽癌的侵袭和转移。

Caveolin-1(CAV1) 是一个绞架蛋白,其在不同的肿瘤中似乎发挥了不同的作用,可促进或者抑制肿瘤生长。Trimmer 和 Han 等^[5-6]发现,过表达的 CAV1 通过抑制 Integrin/Src/FAK 从而抑制黑色素瘤的侵袭和转移。然而,另外一些学者^[7]发现,过表达的 CAV1 能促进肿瘤细胞的侵袭和转移,这其中就包括了鼻咽癌;CAV1 上调表达能促进细胞游走,并且与鼻咽癌患者预后不良呈明显相关。这提示过表达的 CAV1 是促进鼻咽癌转移的一个因素。

CTSD 是一种蛋白水解酶,活化后可以直接催化基底膜和细胞外基质的降解,形成局部溶解区,构成肿瘤细胞移动的通道,并间接破坏血管基膜。CTSD 基因在多种癌组织中表达上调,包括大肠癌^[8]、乳腺

癌^[1]和卵巢癌^[2]等,其参与了这些肿瘤的发病和侵袭过程。基于 *CTSD* 在高转移的鼻咽癌细胞中表达上调,提示其参与了 5-8F 细胞的恶性表型。

NME1 基因是一个公认的肿瘤转移抑制基因。与原发癌灶相比,该基因在许多转移的肿瘤标本中表达都明显下调,这包括了膀胱癌^[3]和黑色素瘤^[4]等。Horak 等^[5]发现,在 Nm23-H1 导入 MDA-MB-435-获得的肿瘤细胞系中,能通过抑制溶血磷脂酸受体 EDG2 的表达,从而抑制细胞的转移。该基因在高转移的 5-8F 细胞中表达下调,而在非转移的 6-10B 细胞中表达上调,提示该基因是鼻咽癌重要的转移抑制基因。

随着 RNAi 和基因导入技术的兴起,在肿瘤细胞中抑制或者导入这些基因表达已经成为了现实。在后期的实验中,将以这些基因为靶点,通过基因干扰或导入技术,在鼻咽癌细胞中抑制或者恢复这些基因的表达,然后在细胞和动物水平证实这些基因是否参与了鼻咽癌的侵袭和转移,这将为鼻咽癌治疗提供关键的靶点。

参考文献:

- [1] MOULD R F, TAI T H. Nasopharyngeal carcinoma: treatments and outcomes in the 20th century [J]. *Br J Radiol*, 2002, 75(892): 307 - 339.
- [2] RUBINSTEIN R, SIMON I. MILANO-custom annotation of microarray results using automatic literature searches [J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6(1): 12.
- [3] 宋立兵, 鄢践, 简少文, 等. 鼻咽癌细胞亚株不同成瘤与转移潜能的分子机制 [J]. *癌症*, 2002, 21(2): 158 - 162.
- [4] 毛华, 黄纯炽, 赵敏芳, 等. p38MAPK 信号传导通路调控 VEGF 诱导肝癌细胞黏附作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(8): 778 - 783.
- [5] TRIMMER C, WHITAKER-MENEZES D, BONUCCELLI G, et al. CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(19): 7489 - 7499.
- [6] HAN Fei, ZHU Hong-guang. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells [J]. *J Surg Res*, 2010, 159(1): 443 - 450.
- [7] DU Zi-ming, HU Chun-fang, Shao Qiong, et al. Upregulation of caveolin-1 and CD147 expression in nasopharyngeal carcinoma enhanced tumor cell migration and correlated with poor prognosis of the patients [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(8): 1832 - 1841.
- [8] XIE Li-qi, ZHAO Chao, CAI San-jun, et al. Novel proteomic strategy reveal combined alpha1 antitrypsin and cathepsin D as biomarkers for colorectal cancer early screening [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(9): 4701 - 4709.
- [9] 乌拉木, 余科达, 沈镇宙, 等. 组织蛋白酶 D 在乳腺导管内癌及伴早期浸润中的表达及其与复发转移的关系 [J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(4): 247 - 250.
- [10] 陈莉萍, 杨鹰. 组织蛋白酶 D mRNA 转录和蛋白表达与卵巢癌的关系 [J]. *西南国防医药*, 2009, 19(1): 54 - 57.
- [11] KHALED H M, BAHNASSY A A, RAAFAT A A, et al. Clinical significance of altered nm23-H1, EGFR, RB and p53 expression in bilharzial bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 32.
- [12] BAKALIAN S, MARSHALL J C, FAINGOLD D, et al. Expression of nm23-H1 in uveal melanoma [J]. *Melanoma Res*, 2007, 17(5): 284 - 290.
- [13] HORAK C E, MENDOZA A, VEGA-VALLE E, et al. Nm23-H1 suppresses metastasis by inhibiting expression of the lysophosphatidic acid receptor EDG2 [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11751 - 11759.

(责任编辑: 幸建华)

本刊被国外多家数据库收录

《广东药学院学报》继美国《化学文摘》(CA) 收录后,又被下列 2 种数据库收录:

1. 英国皇家化学学会系列数据库

英国皇家化学学会(Royal Society of Chemistry, 简称 RSC) 是国际权威的学术机构,也是化学信息的主要宣传机关和出版商,其宗旨是促进化学研究之发展、应用与传播,其出版的期刊是化学领域的核心期刊。英国皇家化学学会系列数据库合计收录中国期刊 104 种,总计 136 种次。参见免费网站 <http://www.rsc.org/Publishing/CurrentAwareness/index.asp>。

2. 美国《乌利希期刊指南》(Ulrichsweb, Ulrich's Periodicals Directory)

参见网站 <http://www.ulrichsweb.com/ulrichsweb/>。

(本刊编辑部)